

Hemoglobin Vesicles as a Molecular Assembly: Characteristics of Preparation Process and Performances as Artificial Oxygen Carriers

Hiromi Sakai, Keitaro Sou, Shinji Takeoka,
Koichi Kobayashi, and Eishun Tsuchida

Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda
University, Tokyo, Japan

Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo,
Japan

IMPORTANCE OF CELLULAR STRUCTURE

Physicochemical analysis has revealed that the cellular structure of RBCs may not be effective for the facilitated O₂ releasing and binding of Hb molecules in comparison with a homogeneous Hb solution (Vandegriff and Olson, 1984; Page *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2003a); however, nature has selected this cellular structure during its evolution. Historically, Barcroft *et al.* insisted that the reasons for the Hb encapsulation in red blood cells were: (1) a decrease in the high viscosity of Hb and a high colloidal osmotic pressure; (2) prevention of the removal of hemoglobin from the blood circulation; and (3) preservation of the chemical environment in the cells such as the concentration of phosphates (2,3-DPG, ATP, etc.) and other electrolytes (Tsuchida *et al.*, 1995). Moreover, during the long history of the development of Hb-based O₂ carriers (HBOCs) many side effects of molecular Hb have become apparent, such as the dissociation of tetrameric Hb

subunits into two dimers ($\alpha_2\beta_2 \rightarrow 2\alpha\beta$) that may induce renal toxicity, and entrapment of gaseous messenger molecules (NO and CO) inducing vasoconstriction, hypertension, reduced blood flow and tissue oxygenation at microcirculatory levels (Goda *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000a), neurological disturbances, and the malfunctioning of the esophageal motor function (Murray *et al.*, 1995). These side effects of molecular Hb would imply the importance of the cellular structure.

The pioneering work of the Hb encapsulation was performed by Chang (1991) using a polymer membrane. After Bangham and Horne (1964) had reported that phospholipids assemble to form vesicles in aqueous media, and that they encapsulate water-soluble materials in their inner aqueous interior, it was quite reasonable to use such vesicles for the Hb encapsulation. Djordjevic and Miller (1977) prepared a liposome-encapsulated Hb (LEH) composed of phospholipids, cholesterol, fatty acid etc. The Naval Research Laboratory showed the remarkable progress of LEH (Rudolph

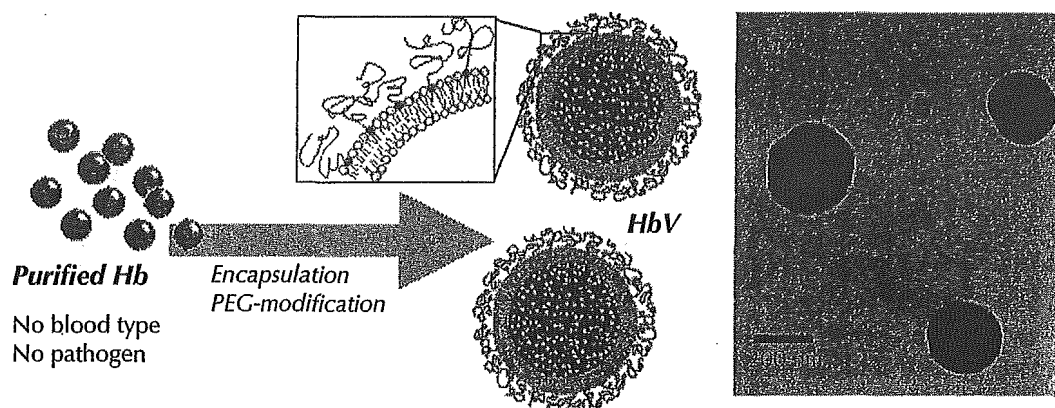


Figure 44.1 Hb vesicles (HbV, diameter ca. 250 nm) are prepared from ultra-pure Hb obtained from outdated RBC. One particle contains about 30 000 Hb molecules. The surface of one HbV is modified with about 6000 polymer chains of PEG that ensure the dispersion stability of HbV during storage and during circulation in the bloodstream. The transmission electron micrograph (TEM) clearly demonstrates the well-regulated particle size and high Hb content within the vesicles. See color plate 22.

et al., 1991). What we call Hb vesicles (HbV) with a high-efficiency production process and improved properties have been established by Tsuchida's group based on the nano-technologies of molecular assembly and precise analyses of the pharmacological and physiological aspects (Tsuchida, 1998; Figure 44.1). The *in vivo* studies of HbV have revealed O₂ transporting efficiency comparable to that of RBCs (Izumi *et al.*, 1996, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2004a; Yoshizu *et al.*, 2004), safety in terms of blood compatibility (Ito *et al.*, 2001; Wakamoto *et al.*, 2001), the importance of the particle size and the cellular structure of HbV (Goda *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000a), and prompt degradation in the reticuloendothelial system (Sakai *et al.*, 2001, 2004b, 2004c, 2004d), all of which make us confident about advancing to the further development of HbV. The joint collaborative partnership of academia (Waseda and Keio Universities), a biotechnology venture company (Oxygenix, Inc., Tokyo) and a corporation (Nipro Co., Osaka) is aiming for clinical trials of HbV within a few years.

In this chapter we scientifically summarize the characteristics of the preparation process of HbV based on the sciences of molecular assembly to induce their excellent performances. It should be emphasized that the components of HbV, lipids and Hb assemble to form a functional nanoparticle through secondary binding forces (hydrophobic interaction, Coulombic force, hydrogen bond, van der Waals force).

PREPARATION OF HEMOGLOBIN VESICLES

Virus inactivation and removal during hemoglobin purification

The primary advantage of artificial O₂ carriers should be no fear of infectious disease derived from human blood. In Japan, the donated blood is strictly inspected by the nucleic acid amplification test (NAT). However, it is necessary also to introduce procedures to inactivate and remove viruses during the process of Hb purification from outdated RBC in order to guarantee the utmost safety from infection, based on the unforgettable tragedy of HIV transmission due to the distribution of non-pasteurized plasma-derived products. In our purification process, virus inactivation was performed by pasteurization at 60°C for 10 hours – the same conditions for the pasteurization of human serum albumin (Sakai *et al.*, 1993; Fukutomi *et al.*, 2002). This process can be introduced by utilizing the stability of carbonylhemoglobin (HbCO). The thermograms of HbCO indicated a denaturation temperature of 78°C, which is much higher than that for oxyhemoglobin (64°C) (Sakai *et al.*, 2002a).

The virus inactivation efficiency was evaluated by the Hokkaido Red Cross Blood Center (Abe *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). The Hb solution spiked with vesicular stomatitis virus (VSV) was treated at 60°C for 1 hour under a CO atmosphere. VSV was inactivated at > 6.0 log₁₀ without methHb

formation and denaturation. Some protein bands other than Hb disappeared on SDS-PAGE and IEF after the heat treatment. During pasteurization, all the other concomitant proteins are denatured and precipitated. As a result, we obtain an ultra-pure Hb solution. This high purity is essential for preventing membrane plugging during the subsequent ultrafiltration process to remove virus. The FDA requires two orthogonal steps of not only virus inactivation but also virus removal.

We tested the ultrafiltration of the HbCO solution to remove viruses with PLANOVA™-35N and -15N (P35N, P15N, Bemberg Microporous Membrane: BMM; Asahi Kasei Co.) (Naito *et al.*, 2002). The virus removal mechanism is by size exclusion through the capillary pores, and a depth filtration. The unit membrane, which has a network structure of capillaries and voids, is accumulated to form 150 layers. P35N and P15N have mean pore sizes of 35 nm and 15 nm, respectively. P35N is suitable for removing envelope-type viruses of which the size ranges from 40 nm to 100 nm, such as HIV, HCV etc., and P15N can be used to remove the non-envelope-type viruses with size of less than 40 nm, such as parvoviruses. The permeation flux and the permeated ratio of the HbCO solution ([Hb] = 5.6 g/dl) through P35N at 13°C were 36 (l/m² per hour) and almost 100 (per cent), respectively. Those through P15N were 15 (l/m² per hour) and 95 (per cent), respectively. Under the same conditions, a high removal efficiency of a bacteriophage, $\phi \times 174$, (>7.7 log) was confirmed. These results indicate that P15N is effective for the process of virus removal from Hb solution. We also confirmed the effectiveness of other virus removal ultrafiltration systems such as Viresolve (Millipore Co.).

The obtained purified HbCO solution can be very effectively concentrated to above 40 g/dl using an ultrafiltration process. After regulation of the electrolyte concentrations, this is supplied for the encapsulation procedure. The ligand of the resulting HbV, CO, is converted to O₂ by illuminating the liquid membrane of the HbV suspension with a visible light under flowing O₂ (Chung *et al.*, 1995).

Other groups have selected the way to preserve the well-organized but relatively unstable enzymatic systems originally present in RBCs, aiming at the prolonged stability of the ferrous state of Hb (Ogata *et al.*, 1997). The enzymatic system can partly be preserved with the compensation of insufficient virus removal or inactivation, but this cannot guarantee the utmost safety of

the resulting HBOCs. One advantage of HbV is that any reagent can be co-encapsulated in the vesicles. It has been confirmed that co-encapsulation of the appropriate amount of a reductant (such as glutathione or homocysteine) and active oxygen scavengers (such as catalase) effectively retards the metHb formation (Takeoka *et al.*, 1997, 2002; Sakai *et al.*, 2000a; 2004d; Teramura *et al.*, 2003). However, our recent idea is that the metHb formation may not be a serious problem in the emergency situation because HbV will be infused to bridge to the blood transfusion in a clinical setting.

Encapsulation of concentrated Hb in HbV

The performance of Hb vesicles depends on the weight ratio of Hb to lipid ([Hb]/[lipids]), that is, the ability to carry more Hb with fewer vehicles made of lipids. This value is improved by lowering the number of bilayer membranes (lamellarity) of the vesicle and raising the concentration of Hb in the interior of the vesicle. We studied the optimal conditions for the Hb encapsulation using the extrusion method, and considered the behaviors of the Hb and lipid assemblies as a kind of polymer electrolyte (Takeoka *et al.*, 1993, 1994a, 1994b, 1996).

The maximum ([Hb]/[lipids]) ratio can be obtained at ~pH 7, which relates to the isoelectric point (pI) of Hb. The Hb molecule is negatively charged when the pH is above 7.0, and the electrostatic repulsion between Hb and the negatively charged bilayer membrane results in lower encapsulation efficiency. However, the lower pH enhances the Hb denaturation by too much interaction with the lipid bilayer membrane and metHb formation at a lower pH. Therefore, the physiological pH, 7.0–7.4, is optimal. It was also revealed that the higher ionic strength shields the repulsion between the negatively charged lipid bilayer membranes and increases the lamellarity.

The number of bilayer membranes decreases with increasing the microviscosity (decreased lipid mobility). Multilamellar vesicles are converted to smaller vesicles with a smaller lamellarity during the extrusion procedure. When the membrane fluidity is high, deformation of the vesicles during extrusion occurs more easily even for multilamellar vesicles, resulting in larger lamellarity in the final vesicles. Therefore, the use of lipids with a higher phase transition temperature is preferred. However, these lipids make extrusion more difficult, because a higher shear rate (high

extrusion pressure) is required. Based on this reasoning, mixed lipids contain dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) as the main component.

Based on the precise analysis of the characterization of the physicochemical properties of the components, the encapsulation efficiency of the Hb solution in a size-regulated phospholipid vesicle has been improved using an extrusion method (Sakai *et al.*, 1996; Sou *et al.*, 2003a). Mixed lipids (DPPC, cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[mono-methoxy poly(ethylene glycol)₅₀₀₀]) at a molar ratio of 5:5:1:0.033 were hydrated with a NaOH solution (7.6 mM) to obtain a polydispersed multilamellar vesicle dispersion (50 nm–30 μm in diameter). The polydispersed vesicles were converted to smaller vesicles having an average diameter of ~500 nm and with a relatively narrow size distribution by freeze-thawing at a lipid concentration of 2 g/dl and a cooling rate of –140°C/min. The lyophilized powder of the freeze-thawed vesicles was rehydrated into a concentrated Hb solution (40 g/dl) and retained the size and size distribution of the original vesicles. The resulting vesicle dispersion smoothly permeated through the membrane filters during extrusion. The average permeation rate of the freeze-thawed vesicles was ~30 times faster than that of the simple hydrated vesicles. During the extrusion process, the Hb solution was effectively encapsulated into the reconstructed vesicles with a diameter of 250 ± 20 nm, and the Hb/lipid ratio reached 1.7–1.8. This improvement of the Hb encapsulation procedure is a breakthrough for the scalability for commercialization.

REGULATION OF OXYGEN AFFINITY

The O₂ affinity of purified Hb (expressed as *P*50, the O₂ tension at which Hb is half-saturated with O₂) is about 14 mmHg, and Hb strongly binds O₂ and does not release O₂ at 40 mmHg (the partial pressure of mixed venous blood). Historically, it has been considered that the O₂ affinity should be regulated to a level similar to that of RBC, namely about 25–30 mmHg, using an allosteric effector or by a direct chemical modification of the Hb molecules. Theoretically, this allows sufficient O₂ unloading during blood microcirculation, as can be evaluated by the arteriovenous difference in the levels of O₂ saturation in accordance with an O₂ equilibrium curve. It has been

supposed that decreasing the O₂ affinity (increasing *P*50) will result in an increase in the O₂ unloading, which is supported by the result that RBC with a high *P*50 shows an enhanced O₂ release for improved exercise capacity in a mouse model (Shirasawa *et al.*, 2003).

If this theory is correct, the *P*50 of Hb in HbV should be equivalent to that of human red blood cells, i.e., 28 mmHg, or higher. Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is co-encapsulated in HbV as an allosteric effector to regulate *P*50 (Sakai *et al.*, 2000b). The main binding site of PLP is the N-terminal of the α- and β-chains and β-82 Lysine within the β-cleft, which is part of the binding site of natural allosteric effector, 2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG). The bound PLP retards the dissociation of the ionic linkage between the β-chains of Hb during conversion of deoxy to oxyHb in the same manner as does 2,3-DPG. Thus the O₂ affinity of Hb decreases in the presence of PLP. The *P*50 of HbV can be regulated to 5–150 mmHg by co-encapsulating the appropriate amount of PLP or inositol hexaphosphate as an allosteric effector (Wang *et al.*, 1992). Equimolar PLP to Hb (PLP/Hb = 1/1 by mol) was co-encapsulated, and *P*50 was regulated to 18 mmHg. When the molar ratio PLP/Hb was 3/1, *P*50 was regulated to 32 mmHg. The O₂ affinities of HbV can be regulated quite easily without changing the other physical parameters, whereas in the case of the other modified Hb solutions their chemical structures determine their O₂ affinities and thus regulation is difficult. The appropriate O₂ affinities for O₂ carriers have not been yet completely decided; however, the easy regulation of the O₂ affinity may be useful in meeting the requirement for clinical indications such as oxygenation of ischemic tissues (Contaldo *et al.*, 2003).

STORAGE STABILITY

Since Hb autoxidizes to form methHb and loses its O₂-binding ability during storage as well as during blood circulation, the prevention of methHb formation is required. Some groups have reported a method of preserving the deoxygenated Hb in the liquid state (Kerwin *et al.*, 1999), using the well-known intrinsic characteristic of Hb that its oxidation rate in a solution is dependent on the O₂ partial pressure and deoxyHb is essentially not autoxidized at ambient temperature (Levy *et al.*, 1988). For the HbV, not only the inside Hb but also the cellular structure has to be physically

stabilized in order to prevent intervesicular aggregation, fusion and leakage of the encapsulated Hb.

The surface modification of phospholipid vesicles with poly(ethylene glycol) (PEG)-conjugated lipid is a well-known method of prolonging the circulation time of the vesicles *in vivo* for drug delivery systems (Klibanov *et al.*, 1990). For HbV, the surface was also modified with PEG chains to improve the dispersion state of the vesicles when mixed with blood components (Yoshioka, 1991). The PEG-modified HbV has shown an improved blood circulation and tissue oxygenation due to the absence of HbV aggregate formation and viscosity elevation (Sakai *et al.*, 1997, 1998) and prolonged circulation persistence *in vivo* (Sou *et al.*, 2003b). However, little attention has been paid to the ability of the PEG modification for the long-term preservation of vesicles or liposomes in the liquid state. We studied the possibility of the long-term preservation of Hb vesicles by the combination of two technologies – surface modification of HbV with PEG chains, and deoxygenation during storage for 2 years (Sakai *et al.*, 2000c). The samples stored at 4° and 23°C showed a stable dispersion state for 2 years, though the sample stored at 40°C underwent precipitation and decomposition of the vesicular components, a decrease in pH, and 4 per cent leakage of the total Hb after 1 year. The PEG chains on the vesicular surface stabilize the dispersion state and prevent aggregation and fusion due to their steric hindrance. The original methHb content (~3 per cent) before the preservation gradually decreased to less than 1 per cent in all the samples after 1 month due to the presence of homocysteine inside the vesicles, which consumed the residual O₂ (thiol groups in homocysteines reacted with oxygen to generate disulfide and active oxygen species) and gradually reduced the trace amount of methHb. The rate of methHb formation was strongly dependent on the O₂ partial pressure, and no increase in the methHb formation was observed due to the intrinsic stability of the deoxygenated Hb. These results clearly indicate the possibility that the HbV suspension can be stored at room temperature for at least 2 years.

Generally, phospholipid vesicles are regarded as unstable capsules; however, the establishment of this pivotal technology will enhance the application of PEG-modified vesicles in other fields. The long-term preservation of O₂ carriers overcomes the limitation of the blood transfusion system and will contribute to benefiting clinical medicine.

ENDOTOXIN

The production process of HbV has to be guaranteed by a good manufacturing practice (GMP) standard as a biological product regarding the strict regulation of impurities and viral and bacterial contamination. Monitoring the content of the lipopolysaccharide (LPS), known as an endotoxin, a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria possessing a large variety of biological influences on numerous mammalian cells and tissues, is strictly required. The US FDA has established a guideline for the human maximal endotoxin dose permissible for parenteral products (5 EU/kg) that may include HBOCs. This limit is based on the endotoxin activity (Endotoxin Unit: EU; 1 EU = 100 pg), and can be measured via the *Limulus amoebocyte* lysate (LAL) assay, in which LAL clots and forms a gel in the presence of LPS (Levin and Bang, 1964). Since the volume of O₂ carriers to be infused for shock resuscitation or acute hemodilution is estimated to be less than 20 ml/kg, the specific endotoxin limits per ml should be 0.25 EU/ml (= 15/20), similar to that for water for injection (0.25 EU/ml).

Bacterial LPS is a gigantic amphiphilic macromolecule, therefore it interacts hydrophobically with protein and biomembranes. Hb strongly interacts with LPS, showing synergistic toxicity. The constituent of endotoxin that causes LAL gelation is a glycopospholipid – designated lipid-A. Lipid-A possesses several fatty acid constituents that are readily inserted into the bilayer membrane of the phospholipid vesicles. The inclusion of lipid-A in the phospholipid vesicles markedly reduces several functions of lipid-A, such as its LAL gelation activity (Richardson *et al.*, 1983). As a consequence, the researchers who have studied HbV or other phospholipid vesicles for delivering other functional molecules have encountered a problem in measuring the LPS content for the quality control of these materials (Cliff *et al.*, 1995; Harmon *et al.*, 1997).

Considering this background information, we tested the solubilization of HbV with deca(oxyethylene) dodecyl ether (C₁₂E₁₀) to release the LPS entrapped in the vesicles as a pretreatment for the subsequent LAL assay of the kinetic-turbidimetric gel clotting analysis using a Toxinometer® (Sakai *et al.*, 2004e). The C₁₂E₁₀ surfactant interferes with the gel clotting in a concentration-dependent manner, and the optimal condition was determined in terms of minimizing the dilution factor and C₁₂E₁₀ concentration. We clarified the condition

that allowed the measurement of LPS higher than 0.1 EU/ml in the HbV suspension.

This modified LAL assay using C₁₂E₁₀ and the Toxinometer® is routinely used in our HbV production system. Significant attention is paid to the quality control of HbV for preclinical studies, and all the HbV prepared under sterile conditions showed an LPS content less than 0.2 EU/ml at [Hb] = 10 g/dl. Moreover, the utilization of the histidine-immobilized agarose gel (Pyrosep®) effectively concentrated the trace amount of LPS from the C₁₂E₁₀-solubilized HbV solution and washed out C₁₂E₁₀ as an inhibitory element. The LAL assay with the LPS-adsorbed gel resulted in the detection limit of 0.0025 EU/ml. The pretreatment with C₁₂E₁₀ would be applicable not only to HbV but also to other drug delivery systems using phospholipid vesicles encapsulating or incorporating functional molecules.

HEMOGLOBIN VESICLES AS OXYGEN CARRIERS *IN VIVO*

The advantages of HbV and other HBOCs are the absence of blood-type antigens and infectious viruses, and stability for long-term storage that outdoes the RBC transfusion. The shorter half-lives of the HBOCs in the bloodstream (2–3 days) limit their use, but they are applicable for a shorter period of use, such as (1) a resuscitative fluid for hemorrhagic shock during an emergency situation for a temporary time or bridging until the packed RBCs are available; (2) a fluid for preoperative hemodilution or perioperative O₂ supply fluid for a hemorrhage in an elective surgery to avoid or delay allogeneic transfusion; (3) a priming solution for the circuit of an extracorporeal membrane oxygenator (ECMO) (Yamazaki *et al.*, 2004); and (4) other potential indications, e.g. so-called O₂ therapeutics to oxygenate ischemic tissues.

One particle of HbV (diameter ~250 nm) contains about 30 000 Hb molecules. Since HbV acts as a particle in the blood and not as a solute, the colloid osmotic pressure of the HbV suspension

is nearly zero. It requires addition of a plasma expander for a large substitution of blood to maintain blood volume. The candidates for plasma expanders are HSA, hydroxyethyl starch, dextran or gelatin, depending on the clinical setting, cost, country concerned and clinicians. Recombinant human serum albumin (rHSA) is the alternative. The absence of any infectious disease from humans is the greatest advantage of rHSA, which will be soon approved for clinical use in Japan. Moreover, there should be no immunological and hematological abnormalities, which are often seen when using dextran and hydroxyethyl starch. Aimed at the application of HbV suspended in a plasma expander for the above indications, HbV was tested in resuscitation from hemorrhagic shock (Sakai *et al.*, 2002b, 2004a; Yoshizu *et al.*, 2004) and extreme hemodilution (Izumi *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 1997, 1998, 1999) in collaboration with Waseda-Keio and Professor Marcos Intaglietta at UCSD. Moreover, HbV with a high O₂ affinity (low P₅₀) suspended in HES or dextran was tested for oxygenation of an ischemic skin flap by Erni *et al.* at the Inselspital University Hospital, Berne (Contaldo *et al.*, 2003; Erni *et al.*, 2003) and the results imply the further application of HbV for other ischemic diseases such as myocardial and brain infarction, and stroke.

SUMMARY

Based on the above establishment of the HbV production system and the potential clinical applications of HbV, significant efforts have been made in the joint collaboration partnership of Waseda-Keio-Oxygenix-Nipro to produce HbV with a facility of GMP standard, and to start preclinical and, finally, clinical trials. Since the combination of recombinant Hb (rHb)-vesicles suspended in recombinant albumin (rHSA) would be the ideal 'artificial red blood cells', this project has recently initiated the next generation HbV (Kai *et al.*, 2004).

EDITOR'S SUMMARY

Liposome encapsulated hemoglobin is a long-sought goal in Japan, where the product is called hemoglobin vesicles (HbV), which distinguishes this product from the one developed primarily in the US, whose designation is LEH. HbV is the result of a long series of studies in which the

size of the vesicles, including the number of lipid layers, the surface composition and materials co-encapsulated have been optimized.

HbV is produced by an extrusion process that has commercial potential, although at this time the product has not yet been produced in

quantities sufficient for clinical trials. Modification of the hemoglobin surface encapsulation, for example by streptozin, and hydroxyethyl starch co-encapsulation or retardation of hemoglobin oxidation. Oxygen affinity is regulated to any desired P50 by co-encapsulation of allosteric effectors, and this group has published numerous studies

on the effect of different P50 on oxygen delivery to tissues by HbV. The product is claimed to be stable when stored for up to 2 years.

A commercial effort has been launched in Japan, and it is hoped that HbV could be in human clinical trials within the next few years.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by Health Sciences Research Grants (Research on Regulatory Science), the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The authors gratefully acknowledge Professor Suematsu and Doctors H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi and E. Ikeda (Keio University), Doctor H. Ikeda (Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo), Doctor M. Takaori (Higashitakarazuka Satoh Hospital), Professor M. Intaglietta (University of California, San Diego), Professor W. T. Phillips (University of Texas, San Antonio), Doctor D. Erni (Inselspital University Hospital, Berne) and their active colleagues for the meaningful discussions and contributions to this research.

REFERENCES

- Abe, H., Ikebuchi, K., Hirayama, J. *et al.* (2001). Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **29**, 381–388.
- Bangham, A. D. and Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structure modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **8**, 660–668.
- Chang, T. M. S. (1991). Blood substitutes based on modified hemoglobin prepared by encapsulation or crosslinking: an overview. *Biomat. Artif. Cells Immob. Biotech.*, **20**, 159–182.
- Chung, J. E., Hamada, K., Sakai, H. *et al.* (1995). Ligand exchange reaction of carbonylhemoglobin to oxyhemoglobin in a hemoglobin liquid membrane. *Nippon Kagaku Kaishi*, **1995**, 123–127.
- Cliff, R. O., Kwasiborski, V. and Rudolph, A. S. (1995). A comparative study of the accurate measurement of endotoxin in liposome encapsulated hemoglobin. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **23**, 331–336.
- Contaldo, C., Schramm, S., Wettstein, R. *et al.* (2003). Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H1140–H1147.
- Djordjevich, L. and Miller, I. F. (1977). Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. *Fed. Proc.*, **36**, 567.
- Erni, D., Wettstein, R., Schramm, S. *et al.* (2003). Normovolemic hemodilution with hemoglobin vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1702–H1709.
- Fukutomi, I., Sakai, H., Takeoka, S. *et al.* (2002). Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator. *J. Artif. Organs*, **5**, 102–107.
- Goda, N., Suzuki, K., Naito, M. *et al.* (1998). Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.*, **101**, 604–612.
- Harmon, P., Cabral-Lilly, D., Reed, R. A. *et al.* (1997). The release and detection of endotoxin from liposomes. *Anal. Biochem.*, **250**, 139–146.
- Huang, Y., Takeoka, S., Sakai, H. *et al.* (2002). Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation. *Biotechnol. Progr.*, **18**, 101–107.
- Ito, T., Fujihara, M., Abe, H. *et al.* (2001). Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils *in vitro*. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **29**, 427–437.
- Izumi, Y., Sakai, H., Hamada, K. *et al.* (1996). Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical oxygen tension. *Crit. Care Med.*, **24**, 1869–1873.
- Izumi, Y., Sakai, H., Takeoka, S. *et al.* (1997). Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *Am. Soc. Artif. Int. Organs J.*, **43**, 289–297.
- Kai, T., Kida, Y., Fukutomi, I. *et al.* (2004). Development of totally synthetic oxygen carriers. *Artif. Blood*, **13**, 34–41.
- Kerwin, B. A., Akers, M. J., Apostol, I. *et al.* (1999). Acute and long-term stability studies of deoxy hemoglobin and characterization of ascorbate-induced modifications. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 79–88.

- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. and Huang, L. (1990). Amphipathic polyethylene glycol effectively prolongs the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, **268**, 235–237.
- Kobayashi, K., Izumi, Y., Yoshizu, A. *et al.* (1997). The oxygen carrying capability of hemoglobin vesicles evaluated in rat exchange transfusion models. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **25**, 357–366.
- Levin, J. and Bang, F. B. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265–274.
- Levy, A., Zhang, L. and Rifkin, J. M. (1988). Hemoglobin: a source of superoxide radical under hypoxic conditions. *Oxy-radicals Mol. Pathol. Proc. Upjohn-UCLA Symp.*, 11–25.
- Murray, J. A., Ledlow, A., Launspach, J. *et al.* (1995). The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology*, **109**, 1241–1248.
- Naito, Y., Fukutomi, I., Masada, Y. *et al.* (2002). Virus removal from hemoglobin solution using Planova membrane. *J. Artif. Organs*, **5**, 141–145.
- Ogata, Y., Goto, H., Kimura, T. and Fukui, H. (1997). Development of neo red cells (NRC) with the enzymatic reduction system of methemoglobin. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **25**, 417–427.
- Page, T. C., Light, W. R., McKay, C. B. and Hellums, J. D. (1998). Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an *in vitro* capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc. Res.*, **55**, 54–66.
- Richardson, E. C., Banerji, B., Seid, R. C. Jr *et al.* (1983). Interactions of lipid A and liposome-associated lipid A with *Limulus polyphemus* amoebocytes. *Infect. Immun.*, **39**, 1385–1391.
- Rudolph, A. S., Klipper, R. W., Goins, B. and Phillips, W. T. (1991). *In vivo* biodistribution of a radiolabeled blood substitute: ^{99m}Tc-labeled liposome-encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10976–10980.
- Sakai, H., Takeoka, S., Yokohama, H. *et al.* (1993). Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr. Purif.*, **4**, 563–569.
- Sakai, H., Hamada, K., Takeoka, S. *et al.* (1996). Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol. Progr.*, **12**, 119–125.
- Sakai, H., Takeoka, S., Park, S. I. *et al.* (1997). Surface-modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90 per cent-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug. Chem.*, **8**, 23–30.
- Sakai, H., Tsai, A. G., Kerger, H. *et al.* (1998). Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethylene glycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 66–78.
- Sakai, H., Tsai, A. G., Rohlf, R. J. *et al.* (1999). Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red cell substitutes: influences of O₂ affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H553–H562.
- Sakai, H., Hara, H., Yuasa, M. *et al.* (2000a). Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H908–H915.
- Sakai, H., Yuasa, M., Onuma, H. *et al.* (2000b). Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 56–64.
- Sakai, H., Tomiyama, K., Sou, K. *et al.* (2000c). Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 425–432.
- Sakai, H., Onuma, H., Umeyama, M. *et al.* (2000d). Photo-reduction of methemoglobin by irradiation in near-ultraviolet region. *Biochemistry*, **39**, 14595–14602.
- Sakai, H., Horinouchi, H., Tomiyama, K. *et al.* (2001). Hemoglobin vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am. J. Pathol.*, **159**, 1079–1088.
- Sakai, H., Masada, Y., Takeoka, S. and Tsuchida, E. (2002a). Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin vesicles for an artificial oxygen carrier. *J. Biochem.*, **131**, 611–617.
- Sakai, H., Takeoka, S., Wettstein, R. *et al.* (2002b). Systemic and microvascular responses to the hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1191–H1199.
- Sakai, H., Tomiyama, K., Masada, Y. *et al.* (2003a). Pretreatment of serum containing Hb vesicles (oxygen carriers) to avoid their interference in laboratory tests. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 222–231.
- Sakai, H., Suzuki, Y., Kinoshita, M. *et al.* (2003b). O₂ release from Hb vesicles evaluated using an artificial, narrow O₂-permeable tube: comparison with RBCs and acellular Hbs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H2543–H2551.
- Sakai, H., Horinouchi, H., Masada, Y. *et al.* (2004a). Hemoglobin vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care Med.*, **32**, 539–545.
- Sakai, H., Horinouchi, H., Masada, Y. *et al.* (2004b). Metabolism of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials*, **25**, 4317–4325.
- Sakai, H., Masada, Y., Horinouchi, H. *et al.* (2004c). Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **311**, 874–884.
- Sakai, H., Masada, Y., Onuma, H. *et al.* (2004d). Reduction of methemoglobin via electron transfer from photoreduced flavin: restoration of O₂-binding of

- concentrated hemoglobin solution co-encapsulated in phospholipid vesicles. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 1037–1045.
- Sakai, H., Hisamoto, S., Fukutomi, I. *et al.* (2004e). Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin vesicles by *Limulus amoebocyte* lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 310–321.
- Shirasawa, T., Izumizaki, M., Suzuki, Y. *et al.* (2003). Oxygen affinity of hemoglobin regulates O₂ consumption, metabolism, and physical activity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 5035–5043.
- Sou, K., Naito, Y., Endo, T. *et al.* (2003a). Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol. Progr.*, **19**, 1547–1552.
- Sou, K., Klipper, R., Goins, B. *et al.* (2005). Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 702–709.
- Takeoka, S., Sakai, H., Nishide, H. and Tsuchida, E. (1993). Preparation conditions of human hemoglobin vesicles covered with lipid membranes. *Jpn J. Artif. Organs*, **22**, 566–569.
- Takeoka, S., Terasa, K., Sakai, H. *et al.* (1994a). Interaction between phospholipid assemblies and hemoglobin (Hb). *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, **A31**, 97–108.
- Takeoka, S., Sakai, H., Terasa, K. *et al.* (1994b). Characteristics of Hb vesicles and encapsulation procedure. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **22**, 861–866.
- Takeoka, S., Ohgushi, T., Terasa, K. and Tsuchida, E. (1996). Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir*, **12**, 1755–1759.
- Takeoka, S., Sakai, H., Kose, T. *et al.* (1997). Methemoglobin formation in hemoglobin vesicles and reduction by encapsulated thiols. *Bioconjug. Chem.*, **8**, 539–544.
- Takeoka, S., Teramura, Y., Atoji, T. and Tsuchida, E. (2002). Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconjug. Chem.*, **13**, 1302–1308.
- Teramura, Y., Kanazawa, H., Sakai, H. *et al.* (2003). The prolonged oxygen-carrying ability of Hb vesicles by co-encapsulation of catalase *in vivo*. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1171–1176.
- Tsuchida, E. (ed.) (1995). *Artificial Red Cells: Materials, Performances, and Clinical Study as Blood Substitutes*. John Wiley, New York.
- Tsuchida, E. (ed.) (1998). *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*. Elsevier, Chichester.
- Vandegriff, K. D. and Olson, J. S. (1984). The kinetics of O₂ release by human red blood cells in the presence of external sodium dithionite. *J. Biol. Chem.*, **259**, 12609–12618.
- Wakamoto, S., Fujihara, M., Abe, H. *et al.* (2001). Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release *in vitro*. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **29**, 191–201.
- Wang, L., Morizawa, K., Tokuyama, S. *et al.* (1992). Modulation of oxygen-carrying capacity of artificial red cells (ARC). *Polymer Adv. Technol.*, **4**, 8–11.
- Yamazaki, M., Aeba, R. and Yozu, R. (2004). Feasibility test of artificial red cells as a priming solution for the extracorporeal membrane oxygenator. *Artif. Blood*, **12**, 45 (abstract).
- Yoshioka, H. (1991). Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with poly(ethylene glycol) prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials*, **12**, 861–864.
- Yoshizu, A., Izumi, Y., Park, S. I. *et al.* (2004). Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier hemoglobin vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma necrosis factor alpha (TNF α). *Am. Soc. Artif. Int. Organs J.*, **50**, 458–463.

4. 酸素輸液（人工赤血球）の臨床応用

4.1 酸素輸液（人工赤血球）とその重要性

我が国では安全な輸血用血液が医療機関に常備され、国民の健康福祉に大きく貢献している。肝炎やエイズなど輸血に伴う感染もかつて大きな社会問題となったが、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、常に被害を最小限に留める尽力により安全になってきている。特に核酸増幅法（NAT検査）の採用効果は多大であるが、Window Periodにおける検査漏れ、検査項目から外れる病原体の存在、それに未知感染源の存在の脅威にも常に曝されている。その他、赤血球の保存期限は採血後わずか3週間、血小板に至ってはわずか3日間である。それに過誤による血液型不適合の医療事故もある。赤血球輸血回避のため、術中輸血開始目安のヘモグロビン（Hb）濃度10 g/dLの低減、低温無輸血手術、また赤血球造血因子の投与による術前貯血も普及してきてはいるが、症例によっては適用できない。献血1回当たりの採血量は400 mLになったが、人口の高齢化に伴い献血者総数は低下し続けている。

このような状況に鑑み、我が国では厚生労働科学研究・医薬安全総合研究事業として、「人工血液」の研究が推進されている。人工赤血球、人工血小板、人工抗体の3部門から構成され、現行の献血・輸血システムの問題点を克服するさまざまな試みが継続されている。

本稿では酸素輸液（人工赤血球）の話題に絞って概説する。急性出血ショック患者の蘇生には、一般的に循環血液量の補給（電解質輸液）が先決で、その後に体組織内の全細胞の呼吸を満足する酸素供給（赤血球輸血）、さらに血漿増量剤の投与による循環血液量の保持が必要とされる。このうち赤血球の酸素運搬機能を代替できる輸液（酸素輸液）はいまだ実現されていない。我が国のように地震など自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応してもつばら酸素を運搬する輸液製剤を安全に大量供給できることは重要な国家的施策でもある¹⁾。

歴史的には酸素溶解度の高いパーフルオロカーボン（FC）をリン脂質で乳化したFluosol-DAが我が国（ミドリ十字社）で開発され、米国FDAの認可（1990年）を受けた唯一の製剤であることは誇るべき事実でもある。しかし、用途が経皮経管冠動脈拡張術後の灌

流に制限された。実質的には相対的酸素溶解度が低いこと、形態の不安定度、肺胞膜表面の活性物質への影響、蓄積性の問題、それに必要量の酸素量が十分輸送できないなど用途が確定せず、生産を停止（1993年）した。

我が国ではその後、ヒトヘモグロビンを利用するHb小胞体²⁾が実現間近になってきている³⁾。また、アルブミンに合成ヘムを担持させた完全合成系の酸素輸液も具体的になってきているので、ここに紹介する。

4.2 ヘモグロビン小胞体

4.2.1 分子集合体としてのHb（ヘモグロビン）小胞体の構成

赤血球は直径約8 μmの中窪み円盤状粒子であり、酸素を結合できる蛋白質ヘモグロビン（分子量64,500）の高濃度溶液（約35%）を赤血球膜に被覆された構造をしている。膜で覆われている理由は、①35%濃厚Hb溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、②毒性のあるHb逸脱の抑制、③Hb機能維持のための各種リン酸類（エネルギー分子）、また解糖および還元一酵素系保持の役割もある。それに、④血液（血球分散系）は非Newton流体で、体内循環、特に末梢血管内における特色ある流動形式と生理作用（ホメオスタシス）特性による。これら赤血球本来の構造と機能の関係が初めから解明されていれば、小胞体（細胞型）構造が無害投与の必要条件との結論が容易に想定できたはずである。

1960年代後半に両親媒性分子であるリン脂質が水相系で二分子膜を形成、これが小胞構造になること、1970年代初めにイリノイ大学のDjordjevichらは、リン脂質二分子層膜で覆った小胞構造“Synthetic Erythrocyte”の研究を開始した⁴⁾。ただし、粒径制御など調製の困難さ、血漿蛋白質との相互作用に起因する凝集阻止に十分な手段が得られなかったので具体化しなかった。リン脂質二分子膜で高濃度Hb溶液を被覆する技術、特に毛細血管を容易に通過できる粒径の制御、また血中分散安定度の向上は、高分子科学と分子集合科学に立脚した工夫（1980年代）を組み込んで、ようやくHb小胞体として完成（図16.4.1）した。

高純度・高濃度Hb溶液（濃度35%以上）を脂質分子二層膜（厚さ5 nm）で被覆させた小胞体（平均

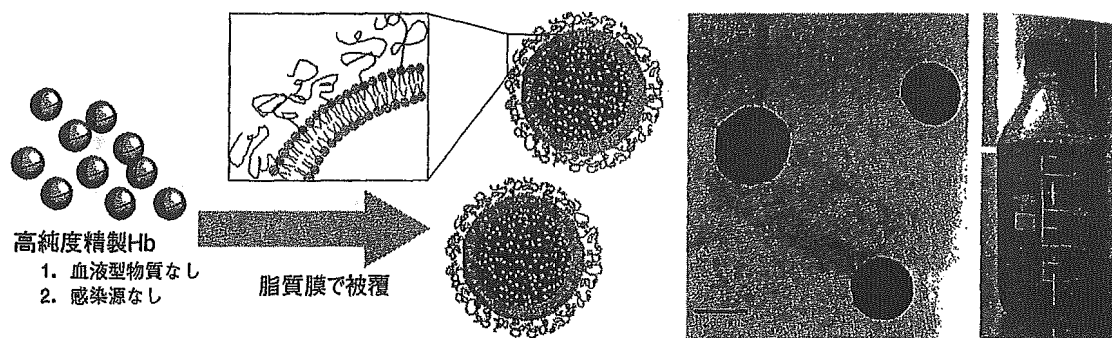


図 16.4.1 ヘモグロビン小胞体

高純度 Hb をリン脂質二分子膜で被覆。粒子表面はポリオキシエチレン鎖で修飾。右側の TEM 写真から、制御粒子径 (250 nm) と Hb が濃度高く充填されている様子がわかる。

粒径 250 nm) を可能とした²⁾。脂質成分と Hb が分子間相互作用 (2 次的相互作用: 疎水的相互作用、静電的相互作用、水素結合など) だけで形成されている分子集合体である。この粒子には 1 粒当たり 3 万個の Hb が濃度高く充填されている。原料 Hb は NAT 検査済みの献血血液の期限切れ赤血球由来で、精製に際し 60℃ の加熱処理 (pasteurization) とウイルス除去膜処理 (ultrafiltration) の組み合わせで、感染に対する安全を確保している⁴⁾。約 1500 本のポリオキシエチレンを粒子表面に配置して小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度向上が得られ⁵⁾、溶液のまま室温にて 2 年以上の保存が可能である⁶⁾。

4.2.2 輸血代替としての Hb 小胞体

Hb 小胞体粒子分散液は膠質浸透圧を持たないので、血液交換率が高い場合には循環血液量を維持するために、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、認可間近とされる 5% γ -Albumin (rHSA) 水溶液に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 mmHg、粘度と浸透圧は血液とほぼ同等に調節、循環動態の恒常性に寄与する⁷⁾。Hb 小胞体の粒径は赤血球の約 1/30 と小さく、血漿中に均一分散できる。

Hb 小胞体の動物投与試験では、交換輸血法で循環血液量の 90% 超過の交換でも血圧が維持され、また血液ガス組成も腎皮質の酸素分圧も正常値を推移することを確認している。臨床現場で想定される最大の交換率 40% の交換輸血において、ラットは全例が生存し、ヘマトクリット (赤血球体積分率) が 1 週間で完全に回復する。Hb 小胞体は最終的に細網内皮系に捕捉され、安全に分解、排泄される⁸⁾。

したがって、臨床では術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに胸部外科手術における人工心肺 (ECMO)

体外循環回路の補充液としての利用が十分に期待できる。特に小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合 (血漿増量剤の充填)、術中短時間の Hb 濃度低下が脳に後遺症を与え術後の知能発達に影響するともされており、Hb 小胞体を充填液として用いることの利点も期待できる。

出血ショック時の蘇生液としても検討され⁷⁾、赤血球と同等の酸素運搬機能を実証している。例えば、Sevoflurane 麻酔下、ラットの循環血液量の 50% を脱血して 15 分後に Hb 小胞体を 5% rHSA に分散させて投与し 6 時間観察する。rHSA 単独の投与では 8 匹中 2 匹の死亡に対し、Hb 小胞体の投与では、循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移し、全例が生存 (図 16.4.2) できる⁷⁾。現在、ウサギやビーグル犬を用いた出血ショック蘇生試験も開始しており、概ね良好な成績が得られている。

これから Hb 小胞体が医療現場にて使用できるようになれば、特に救急医療や外科的手術において、血液型不一致や感染の心配をせずにいつでも要求に応じて投与し、同種血輸血の回避または必要量の低減が可能となることも示唆できた。

4.2.3 Hb 小胞体の安全性

① 循環動態の恒常性

欧米で開発が進められてきた Hb に化学的修飾を加えた形式 (分子内架橋、重合型、PEG 結合型) では、投与に際し血圧の異常亢進あるいは食道蠕動の運動障害など副作用が明らかとなり、開発中断を余儀なくされたものもある。これは NO の高い親和度に起因すると考えられる¹⁾。ハムスター皮下微小循環系の抵抗血管径と血圧変動の相関追跡では、修飾 Hb (特に分子内架橋 Hb、粒径 7 nm) で抵抗血管径が最大収縮とな

り、同時に顕著な血圧亢進を示す。血管収縮は末梢循環を阻害し、組織へ十分量の酸素供給が疎外される。粒子径が大きくなるにつれこれらの変動値は小さくなり、直径 250 nm の Hb 小胞体では血管収縮も血圧亢進も生起しないことが確認されている。現在のところ、分子状の修飾 Hb は、血管内皮細胞層を透過し血管内平滑筋近傍に到達、内皮細胞が産生する NO を捕捉するので、血管弛緩機能が低下する。直径 250 nm の Hb 小胞体では赤血球と同様に平滑筋までは到達できず血管内腔に留まるため、血管収縮も血圧亢進も起こらない。

肝臓中では肝実質細胞にある hemoxygenase がヘムを分解する。実はこの際に産生する一酸化炭素 (CO) が、血管弛緩因子として血管内壁 (Ito 細胞) に作用するのが明確に示された。摘出肝灌流中の微小循環動態の検討は、類洞血管の孔 (穿孔節: fenestration、孔径約 100 nm) よりも小さい修飾 Hb (7 nm) では、これを容易に通過し Disse 腔に侵入、肝実質細胞で代謝され bilirubin 排泄の亢進と同時に CO を放出する。CO 親和度の高い血中 Hb に捕捉され、結果として 20% の血管抵抗増大と同時に、類洞の不連続的狭窄と流動停止領域の存在が観測されている。他方は Hb 小胞体は粒径が 250 nm と大きいので、類洞血管孔を透過できず肝実質細胞に到達しないためこの現象は生起せず、この間灌流圧は一定値に保たれる (図 16.4.3)。

この結果は臓器移植の際に Hb 小胞体を灌流液として安全使用できることも意味し、摘出から移植までの所要時間を延長できる。移植臓器を従来よりも遠隔地に運搬が可能となる。

②体内動態と代謝過程

酸素輸液の投与は血液量の大半を置換する大量投与も前提となるので、成分の体内動態と代謝過程の詳細検討が必要となる。これまでの検討では、投与 Hb 小胞体は最終的に貪食細胞が多く存在する脾、肝、骨髓など、いわゆる細網内皮系 (RES) への移行が同位元素 (^{99m}Tc) 修飾した Hb 小胞体の体内動態観測から解明され⁹⁾、RES 機能への影響と Hb 小胞体の構成成分の代謝確認も実施された。

これら詳細検討は、貪食細胞に捕捉された Hb 小胞体が 7 日以内に分解消失 (図 16.4.4) し¹⁰⁾、また脾臓重量も一過性増大を示すものの 7 日後には正常値に戻り、血液生化学検査でも異常値は認めないので、老化赤血球の代謝経路と同様と考えられる。また、40% の血液を急速交換した後の生存試験 (ラット)

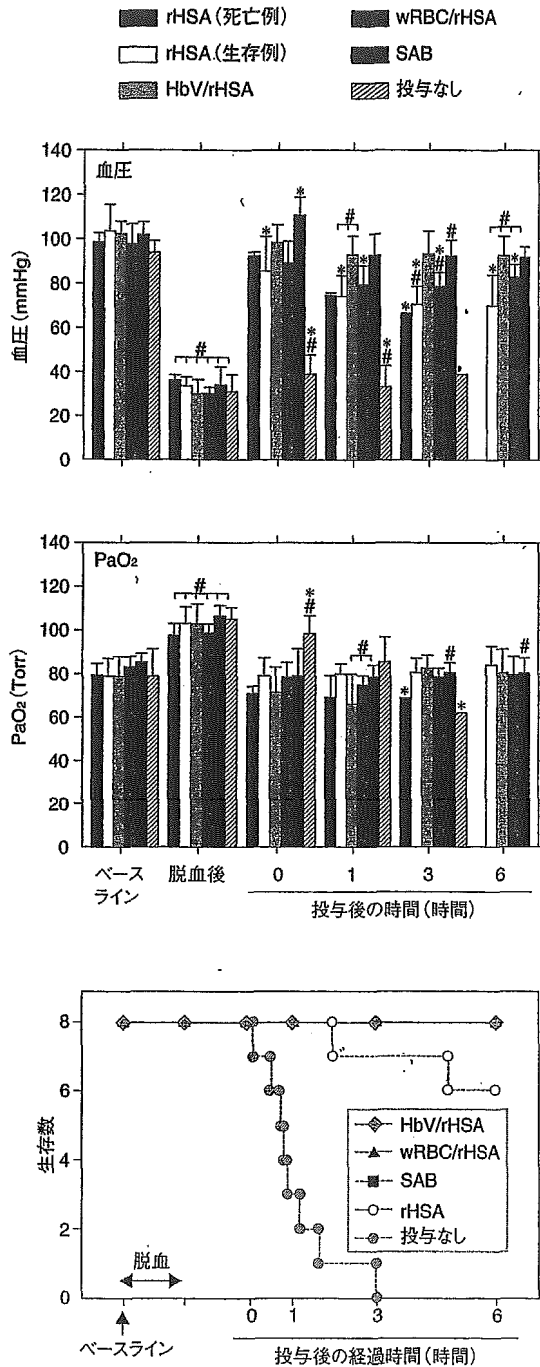


図 16.4.2 ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生試験

#p < 0.05 vs baseline

*p < 0.05 vs the HbV/rHSA group

Sevoflurane 吸入麻酔下、ラット循環血液量の 50% を脱血、15 分経過後、Hb 小胞体を rHSA に分散させて投与。ショック状態では血圧低下、代償機能により過呼吸、動脈血酸素分圧 (PaO₂) の上昇、pH と塩基余剰の低下が観測できる。蘇生液の投与がないと全例が死亡。rHSA 群は 8 匹中 2 匹が死亡、HbV/rHSA 群は全例生存。

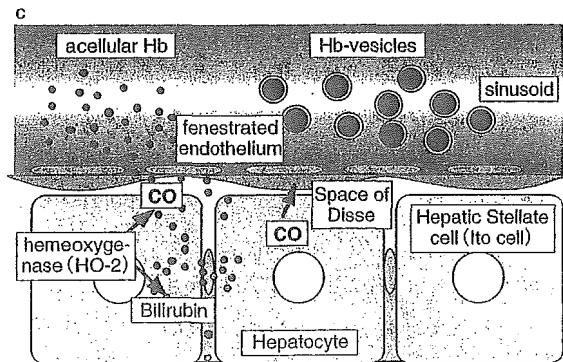
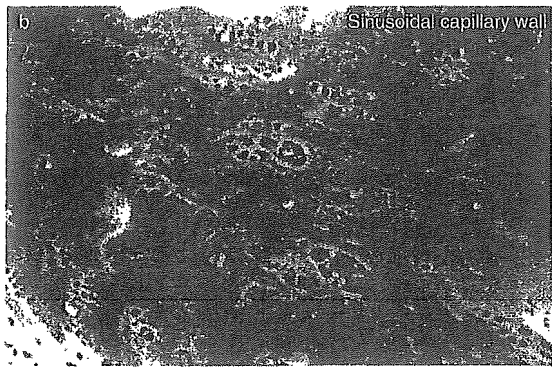
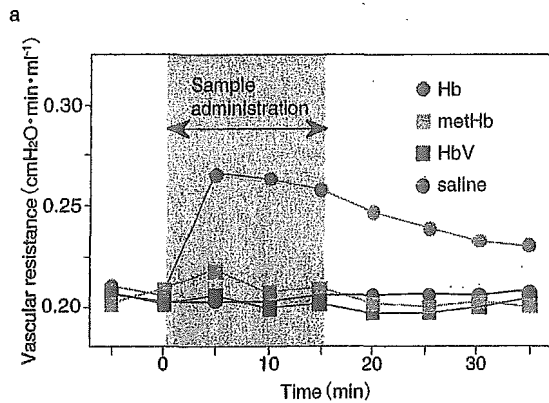


図 16.4.3 肝の微小循環動態と Hb 代謝

- a : Hb 溶液で摘出肝を灌流すると灌流圧が上昇するが、Hb 小胞体と metHb の場合には灌流圧上昇はない。
- b : 肝類洞血管には無数の孔 (fenestration) が開いている。
- c : Hb 分子はこの孔を通して Disse 腔に拡散、ヘムは肝実質細胞の hemeoxygenase-2 により代謝され、ビリルビンと CO を排泄。

CO は血管弛緩因子として作用するが、Disse 腔で Hb に捕捉され弛緩作用が低下し、灌流圧が増大。Hb 小胞体は孔より大きいので通過なし、CO 結合なしのため肝臓の微小循環低下はほとんどない。また metHb は Disse 腔に拡散するが CO 結合しないため変化なし。

では、約 1 週間後には赤血球量は正常値に回復していることから⁸⁾ Hb 小胞体成分は造血に有効利用されていると想定され、詳細検討中である。

新薬非臨床試験の場合、安全度確認の項目として、GMP 基準での製造試料について齧歯類とその他の動物を対象とした反復投与試験がある。予備的にラットに対して Hb 小胞体の反復投与試験 (投与量 10 mL/kg/日を 14 日間投与) を実施、循環血液量の 2.5 倍の分散液を投与したが、体重は継続して増加を続け、血液生化学的、組織病理学的検討でも顕著な副作用はなく、結果として Hb 小胞体成分が速やかに代謝される過程が得られ、安全度がきわめて高い製剤と証明されている¹¹⁾。

4.2.4 低酸素領域への酸素輸送

ヒト赤血球の酸素親和度 (P_{50} : 酸素が 50% 結合飽和するときの酸素分圧) は、37℃で約 28 Torr である。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧 (110 Torr) と静脈血酸素分圧 (40 Torr) の間の酸素飽和度差

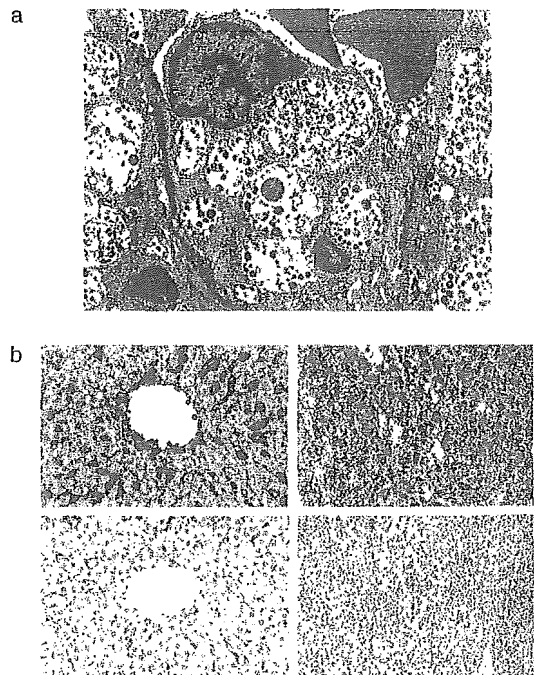


図 16.4.4 ヘモグロビン小胞体の代謝過程 (b : 口絵 50 参照)

- a : Hb 小胞体投与 1 日後のラット脾臓 macrophage の透過型電子顕微鏡写真。食胞 (phagosome) 中に Hb 小胞体粒子を多数認める。7 日後にはほとんど消失。
- b : Hb 小胞体投与後のラット肝臓 (左)、脾臓 (右) 組織の顕微鏡写真。抗ヒト Hb 抗体染色による赤染はヒト Hb の存在部位。7 日後にはほとんど消失、蓄積はまったく認めず。

(A-V 較差、ヒト赤血球の場合は 25 % 程度) と Hb 濃度、それに心拍出量の積として算出される。赤血球から精製単離した Hb の P_{50} は 8 Torr 程度と低く、静脈血酸素分圧 (40 Torr) では酸素放出は生起しない。また、Hb を利用する人工酸素運搬体の P_{50} も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべきと考えられてきた。

正常組織であればこの理論が成立する。しかし、血管性障害により十分な血流が行き届かない組織 (虚血性領域) の場合、血流速度も組織酸素分圧も極度に低下しており、動脈血はこの領域に到達する前に酸素を放出してしまう。つまり、酸素親和度を赤血球よりも大きく (P_{50} 値を小さく) すれば、虚血性領域に到達してからの酸素放出可能と考えた¹²⁾。このとき赤血球よりも小粒径の人工赤血球 (250 nm 径) は血漿中に均一に分散しているため、赤血球では届かない狭窄部を経由して到達できる。

この仮説の下では、これまでにハムスター有茎皮弁虚血モデルにおいて、高酸素親和度 Hb 小胞体 (P_{50} : 15 Torr) での血液希釈により虚血領域の酸素分圧が有意に上昇できることが証明された¹³⁾。した

がって、輸血代替としての利用以外に酸素治療剤としての適応症、例えば脳や心筋など虚血領域の酸素化、腫瘍組織の酸素化など、低酸素領域へ選択的な酸素ターゲティングとして利用できる。Hb 小胞体の酸素親和度はアロステリック因子により自在に調節できるので、各々の適応にふさわしい P_{50} を有するテラーメード人工赤血球が可能となる。

4.3 アルブミン-ヘム

4.3.1 酸素を輸送できる赤色のアルブミン

他方、Hb をまったく利用しない完全合成系酸素輸液の開発も進んでいる。血清アルブミン (Mw. 66.5 kD) は血漿蛋白質の約 70 % を占める単純蛋白質であり、コロイド浸透圧の維持/各種内因性物質・薬物の運搬/血液 pH の調整などの役割を果たしているが、我が国では世界に先駆けて組替ヒト血清アルブミン (rHSA) の大量発現に成功しており、世界初の上市を間近に控えている。年間 100 万パイアルの生産ラインの稼働体制も整い、血漿増量剤としてだけでなく、各種製剤の基材としての活用にも国際的注目が集まっているので、このアルブミンの非特異的多分子結合能を利用して、rHSA に酸素配位能を有するヘム誘導体を包接させ、従来類例のない新しい合成ヘム蛋白質「アルブミン-ヘム」が創製できる (図 16.4.5)^{14,15)}。

アルブミン-ヘムは、①完全合成系酸素輸液であり、感染の危険性がなく、②一切のヒト (および動物) 由来の血液資源を必要としない。また、③ P_{50} はヘム構造の調整により調節可能、④アルブミンが血管内皮を透過しないため NO 捕捉に伴う血管収縮・血圧亢進は惹起されない、などの多くの優れた特長を持つ。すでに酸素輸液としての酸素結合能/溶液物性/血液適合性が実証されており、安全性と効果の解明を中心とした前臨床評価試験も進められている。

4.3.2 構造と酸素結合能

アルブミン 1 分子あたりに結合するヘムの数は最大 (8 個/分子) であり、これは Hb の 2 倍に相当する。ヘムの結合定数は $1.2 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^4$ (M^{-1})、包接の駆動力は疎水性相互作用であるため、結合後もアルブミンの 2 次構造や表面電荷に変化はない。しかし、1998 年インベリアルカレッジの Curry らが、脂肪酸包接 rHSA の X 線結晶構造解析に初めて成功し、基質結合後の rHSA は幅 8 nm から 9 nm へ膨張することが明らかにされた¹⁶⁾ (図 16.4.6)。この発見はヘムが rHSA 内部に包接されると数 nm の範囲では微細な構造変化が誘起されることを示唆しており、酸素配位

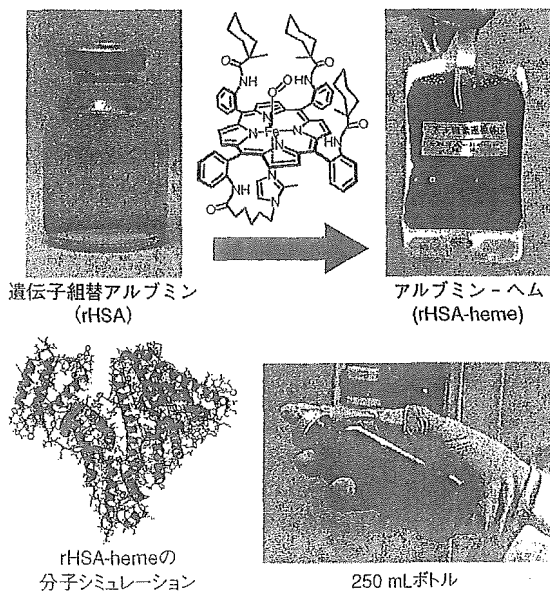


図 16.4.5 アルブミン-ヘム

組替ヒト血清アルブミンに合成ヘムを包接させたアルブミン-ヘムは、酸素輸送のできる血漿蛋白質となる。最大 8 分子のヘムを包接させても、アルブミンの構造、物性、表面電荷は変化なし。酸素輸送能はヒト赤血球と同等、2 年以上棚置き保存も可能。アルブミン-ヘムの生理食塩水溶液は Hb を一切必要としない完全合成系酸素輸液。

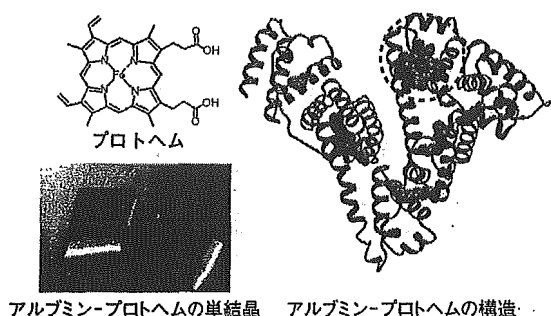


図 16.4.6 アルブミン-プロトヘムの単結晶の写真と分子構造 (口絵 51 参照)

特性の変化とも関連してアルブミン-ヘム結晶構造の解明が待たれている。

また、酸素配位結合部位であるヘムの化学構造（酸素配位座近傍置換基、分子内軸塩基など）を変化させた一連の誘導体群が合成され、rHSA 包接体とした系についてヘム構造と酸素配位能の相関が定量的に明らかにされている¹⁶⁾。Hb と同じヒスチジン残基を軸塩基としたモデルの場合、非常に安定な酸素錯体が観測できる点は大変興味深い¹⁶⁾。

4.3.3 体内酸素輸送能

アルブミン-ヘム水溶液の血液適合性は高く、全血液と混合してもヘムの解離・転移を起こさない。また、赤血球数、白血球数、血小板数のみならず血液凝固系パラメーターにも変動がないことが確認されている。溶液安定度は高く、室温で2年間以上の保存も可能である。

一方、アルブミン-ヘムもヘム蛋白質であるから、NO 親和度は O_2 親和度の 7.6×10^6 倍と高いが、それを体内へ投与しても、Hb 製剤にみられる血管内皮からの漏出、NO 捕捉に伴う血圧亢進はまったく認められなかった (図 16.4.7)¹⁷⁾。これは、アルブミンの表面電荷が負に帯電していることに起因するためと考えられており、本製剤の最大の利点である。

このようなアルブミン-ヘムの特徴を巧みに利用すると、閉塞部位への効率の高い酸素供給も可能となる。一般に悪性腫瘍は放射線療法や化学療法に抵抗を示すが、その原因として腫瘍組織内低酸素細胞 (hypoxic cell) の存在がある。細胞の異常増殖は新生血管の生成が追いつかない湿潤性腫瘍細胞では十分な血流および酸素化が得られず、それが上記療法の妨げとなっている。アルブミン-ヘムを腫瘍組織の患部近傍へ投与し、腫瘍組織内低酸素細胞の酸素化を試みた。アルブ

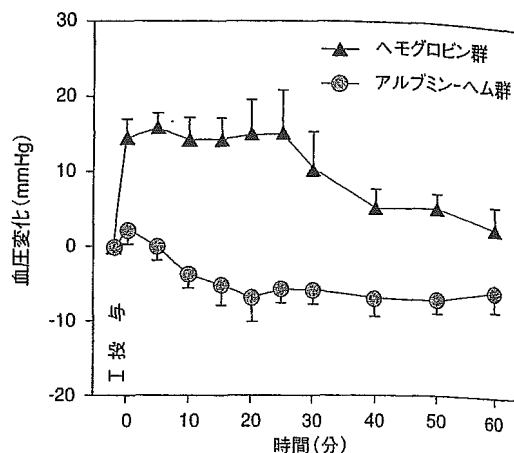


図 16.4.7 アルブミン-ヘム投与後の血圧の変化
分子状 Hb 溶液をラットに静注、瞬時に血圧亢進が生じ、Hb が血管内皮誘導弛緩因子 (NO) を捕捉するため。しかし、同条件下でアルブミン-ヘム溶液を投与しても血圧値に変化はない。アルブミン分子は等電点 (PI: 4.8) で分子雰囲気は負帯電のため、Hb に比べ血管透過性が低いことに起因。

ミン-ヘム投与により患部の酸素分圧は投与前の 2.5 倍に増大¹⁸⁾。これは従来報告の Hb 製剤による処置に比べ格段に高い値、粒子径の小さいアルブミン-ヘムが腫瘍内部へ容易に到達できるためと考えられる。今後、抗癌剤治療や放射線治療との併用により、酸素輸液投与による抗癌作用の増強効果が期待されている。

生体内へ投与され酸素輸送の役割を終えた合成ヘムは肝臓で捕捉され、緩慢代謝に入ることも最近明らかになった。安全度の高いアルブミン-ヘム製剤を出血ショックからの蘇生液として利用する評価実験が、ラット、ビーグル犬を用い進行している¹⁹⁾。

4.3.4 アルブミン-ヘムの新展開

分子化学的手法を駆使した新しいアルブミン-ヘムの展開も進んでいる。アルブミンが還元型 Cys を 1 つ (Cys³⁴) しか持たない特徴に着目して、アルブミン分子を上手に連結すると、構造明確なアルブミン二～四量体が合成できる²⁰⁾。カラム分離により単離された二、三、四量体は MALDI-TOF 質量分析からその分子量が正確に決定され、間違いなくアルブミンが繋がったクラスター構造であることが示されている。アルブミン四量体にヘム 32 分子を結合したアルブミン-ヘム四量体の 20 wt % 水溶液は、コロイド浸透圧を生理条件に保ったまま、血液の 2.6 倍量の酸素を溶解できる酸素輸液となる。

ごく最近、アルブミンに天然のプロトヘムを包接させたアルブミン-プロトヘム錯体の X 線結晶構造解析

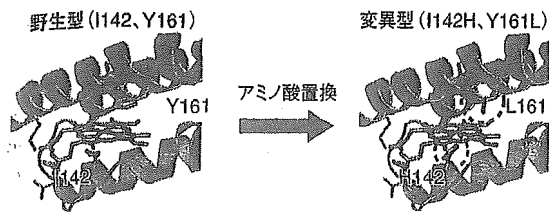


図 16.4.8 組替アルブミン変異体 - プロトヘム (口絵 52 参照)

プロトヘムアルブミンのサブドメイン IB に包接のようにヘム面直下の軸配位を Ile-142 を His に変換し、軸配位 Tyr-161 を疎水性の Leu に変換すると、Hb のヘムポケットと類似の分子空間構成、酸素との結合を可能にする。プロトヘムを用い、水中、室温下で酸素錯体を確認した初めての例 (2005 年)。

に成功し、プロトヘムがサブドメイン IB 内に Tyr-161 との軸配位結合およびプロピオン酸側鎖と 3 つの塩基性アミノ酸残基 (R114, H146, K190) 間との静電的相互作用により固定が明らかにされ (図 16.4.8)²¹⁾、アルブミンのプロトヘム結合サイトは疎水性アミノ酸残基から構成されているので、ヘム鉄の配位圏内に近位塩基 (His) を導入すれば、Hb のヘムポケットと同様なナノ分子空間が構築できるとの着想から、ヘム鉄に最も近い距離にあるアミノ酸残基イソロイシン 142 (I142) を選定し、遺伝子組替法によりこれらをヒスチジン (His) へ変換、さらに軸配位のチロシン 161 (Y161) をロイシン (L) に変換、得られた rHSA (mutant) にプロトヘムを包接、アルブミン-プロトヘムを得る。アルゴン雰囲気下で中心鉄 (III) を還元すると、Hb のデオキシ体によく似た可視吸収スペクトルが得られた²²⁾。これはイミダゾールが 1 つ結合した Fe (II) 5 配位高スピン錯体の形成を示しており、H142 が中心鉄に軸配位が解明され、これに酸素通気により速やかに酸素錯体型へと移行する。また一酸化炭素に接触させると、安定なカルボニル錯体が得られ、そのスペクトルパターンも carbonyl Hb と類似を確認した。これは天然のプロトヘム利用で、水中、室温で安定な酸素錯体が形成の初めての例である。

4.4 おわりに

本稿で紹介した人工赤血球の開発とは別に、最近の試みとして、血液幹細胞に各種サイトカインを作用させ、赤血球のみを選択的に増殖させる新技術も明らかにされ期待されている。投与量確保に至っていないのが実情で、ただし人工赤血球は、赤血球の体内寿命 (120 日) に比較してきわめて短い (3 日程度) ため短時間の使用に限られるが、血液型や感染源がなく、長

期間保存できる点は赤血球の性能を凌いでいる。輸血代替としての利用はもちろん、移植臓器灌流液、組織再生時の細胞呼吸への酸素供給、さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応 (虚血性領域の酸素化、抗腫瘍効果増強など) も提案され、近未来の医療に著しい変革をもたらすものと予告とみることが可能であろう。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) として推進された。早稲田大学および慶應義塾大学の大部分の研究者の御尽力に対し、ここに記して謝意を表する。

文献

- 1) Kobayashi K, et al: Artificial Oxygen Carrier, Its Front Line. Springer-Verlag, Tokyo, 2005
- 2) Tsuchida E: Artificial Red Cells. Wiley, Chichester, 1998
- 3) Djordjevich L, et al: Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. FASEB Proc 36: 567, 1977
- 4) Sakai H, et al: Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. Protein Expr Purif 4: 563-569, 1993
- 5) Sou K, et al: Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. Bioconjugate Chem 11: 372-379, 2000
- 6) Sakai H, et al: Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. Bioconjugate Chem 11: 425-432, 2000
- 7) Sakai H, et al: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. Crit Care Med 32: 539-545, 2004
- 8) Sakai H, et al: Acute 40 % exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 Weeks. Transfusion (in press)
- 9) Sou K, et al: Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. J Pharmacol Exp Ther 312: 702-709, 2005
- 10) Sakai H, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol 159: 1079-1088, 2001
- 11) Sakai H, et al: Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. J Pharmacol Exp Ther 311: 874-884, 2004
- 12) Sakai H, et al: Oxygen Releasing of Hb-vesicles with different P_{50s} from Occluded Arteriole in Hamster Skinfold Window Model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H2897-H2903, 2005

- 13) Contaldo C, et al: New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med* **33**: 806-812, 2005
- 14) Tsuchida E, et al: Human serum albumin incorporating tetraalkyl(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* **10**: 797-802, 1999
- 15) Komatsu T, et al: Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* **13**: 397-402, 2002
- 16) Curry S, et al: Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding site. *Nat Struct Biol* **5**: 827-835, 1998
- 17) Tsuchida E, et al: Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* **64A**: 257-261, 2003
- 18) Kobayashi K, et al: Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* **64A**: 49-51, 2003
- 19) Komatsu T, et al: Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* **71A**: 644-651, 2004
- 20) Komatsu T, et al: Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim Biophys Acta* **1675**: 21-31, 2004
- 21) Zunszain P, et al: Crystal structural analysis of human serum albumin complexes with heme and fatty acid. *BMC Struct Biol* **3**: 6, 2003
- 22) Komatsu T, et al: Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket. *J Am Chem Soc* **126**: 14304-14305, 2004
(土田英俊、酒井宏水、小松晃之、小林紘一)

先端医療シリーズ 37

人工臓器・再生医療の最先端

発行 2005年11月28日 初版第1刷 ©
編集主幹 許 俊鋭・斎藤 明・赤池敏宏
編集委員 西田 博・澤 芳樹・浅原孝之・清水達也
発行者 代表取締役 寺田弘司
株式会社寺田国際事務所／先端医療技術研究所
〒171-0031 東京都豊島区目白 2-16-19
池袋若林ビル 11F
電話 03-5957-1180 FAX 03-5957-1182
E-mail:kterada@t3.rim.or.jp
<http://www.t3.rim.or.jp/~kterada/>
印刷 株式会社プレインズ・ネットワーク

(無断複写・転写を禁ず)

ISBN4-925089-45-5 C3047

定価 9,800 円(税込)

Printed in Japan



微小血管内を均一に流れる人工赤血球とその運命

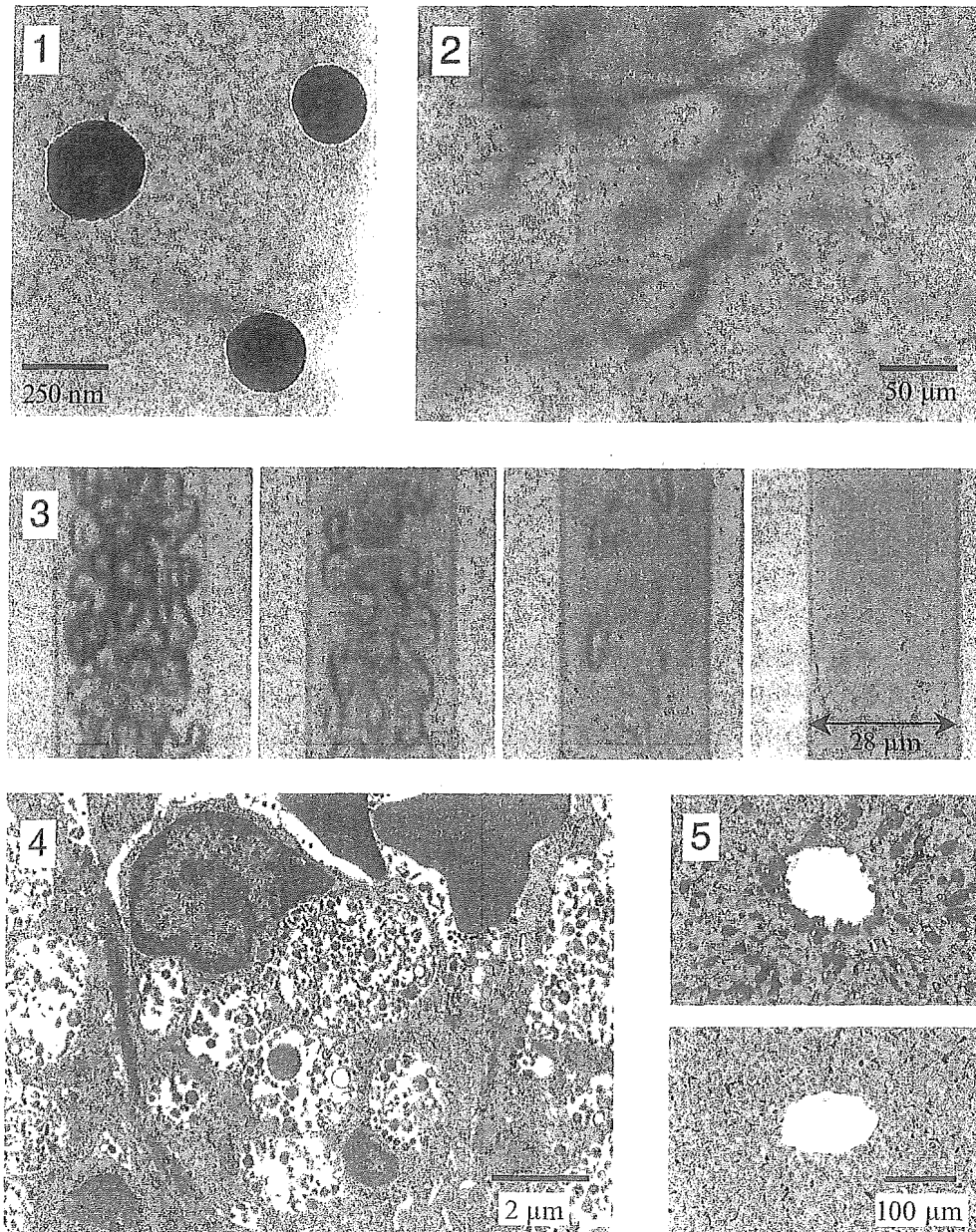


図1 人工赤血球 (Hb 小胞体) の透過型電子顕微鏡像

*写真左上の数字は図の番号です。

- 2 循環血液量の 80% を Hb 小胞体で交換した後のハムスター背部皮下微小循環の光学顕微鏡像 波長 420nm 付近の光 (Hb の吸収帯) を照射して撮影。
- 3 赤血球と Hb 小胞体を混合し、プラスチック製のモデル血管内を流動させたときの光学顕微鏡像 混合容積比は左から、赤血球/Hb 小胞体 = 100/0, 50/50, 10/90, 0/100。
- 4 Hb 小胞体投与 1 日後のラット脾臓マクロファージの透過型電子顕微鏡像
- 5 Hb 小胞体投与 1 日後 (上)、7 日後 (下) の肝臓組織の抗ヒト Hb 抗体免疫染色像



ヘモグロビン小胞体は、高純度ヒトヘモグロビン(Hb)をリン脂質小胞体(リポソーム)に内包した人工赤血球である。何と、脂質成分とHbが分子間相互作用だけで形成している分子集合体である。透過型電子顕微鏡写真(図1)から、精密制御された粒子径(250nm)と、Hb(約30000個)が濃度高く内包されている様子が解る。粒子表面は約6000本のpoly(ethylene glycol)鎖で修飾しており、室温で2年間の保存も可能な優れた安定度を有する。光学顕微鏡では粒子の形状は観察できないが、ハムスターの循環血液量の80%を交換したのちの皮下微小循環の観察では、Hb小胞体は血漿中に均一に分散し、通常は見えない毛細血管の形状までもがコントラストよく見える(図2)。愛媛大学医学部との共同で、赤血球と種々の比率で混合し、モデル血管内(28 μ m径)を1mm/sの流速で流動させた実験では、赤血球(8 μ m)は管の中心側を流動するのに対し(図3)、血漿層の濁りからHb小胞体は均一分散して管壁側を流動する様子が解った。慶応義塾大学医学部ほかとの共同によるHb小胞体の交換輸血試験、出血ショック蘇生試験では、赤血球と同等の酸素運搬機能が実証されている。加えて、赤血球に比較して小粒径で均一分散するので、血管狭窄部の透過、あるいは側副経路を経由した虚血性低酸素領域への酸素運搬にも有効であることが解ってきた(Univ. California, San Diego および Inselspital Univ. Hospital, Bern との共同)。Hb小胞体は酸素運搬の機能を終えたのち、最終的には老化赤血球と同様に細網内皮系(主に脾、肝)に捕捉される運命をたどる。Hb小胞体をラットに投与し(20mL/kg)、1日後の脾臓を電子顕微鏡観察すると、マクロファージ食胞内にHb小胞体が多数捕捉されていたが(図4)、7日後には完全に消失した。また、抗ヒトHb抗体を用いた肝臓の免疫染色(図5)では、投与1日後にはKupffer細胞に捕捉されたHb小胞体が赤染部位として認められたが、7日後には完全消失しており、Hb小胞体は蓄積することなく、速やかに分解排泄される様相まで明らかになった。

血液型物質を含まず、感染の心配がなく、しかも長期間備蓄可能な人工赤血球の実現は、医療技術に変革をもたらすことは間違いない。現在は、担当企業に技術移転を行い、夢を膨らませて臨床試験に向けた最終作業を進めている。

(酒井宏水、土田英俊)

キーワード：人工赤血球、微小循環、ヘモグロビン、リポソーム、輸血代替

筆者紹介：さかい・ひろみ(SAKAI, Hiromi) 早稲田大学理工学総合研究センター(Adv. Res. Inst. for Sci. and Eng., Waseda Univ.)助教授 1994年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了 博士(工学) 専門：血液代替物科学 連絡先：〒169-8555 新宿区大久保3-4-1 E-mail hiromi@waseda.jp (勤務先)
 つちだ・えいしゅん(TSUCHIDA, Eishun) 同上 名誉教授 1963年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了 工学博士 専門：高分子錯体 連絡先：同上